

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 200445004

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

几种纳米材料的体内
生物相容性及生物分布的研究

The Study on *In vivo* Biocompatibility &
Biodistribution of Several Nanoscale Materials

张 斌

指导教师姓名: 任 磊 副教授

张其清 教授/博士生导师

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2007 年 06 月

论文答辩时间: 2007 年 xx 月

学位授予日期: 2007 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2007 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非盈利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打：“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目录

中文摘要	I
英文摘要	II
第一章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 纳米材料的四大效应	1
1.3 纳米颗粒入侵人体的途径及去向	3
1.4 纳米颗粒毒性作用的影响因素	6
1.5 纳米材料生物效应可能的作用机制	8
1.6 本课题的研究背景	10
1.7 本研究的提出和研究内容	15
参考文献	18
第二章 Au 纳米颗粒生物分布的初步研究	22
2.1 引言	22
2.2 仪器与材料	22
2.3 实验方法	24
2.4 结果与讨论	30
2.5 本章小结	64
参考文献	66
第三章 近红外敏感的 Au-Au ₂ S 纳米颗粒作为药物释放载体的体内生 物相容性和生物分布的研究	67
3.1 引言	67
3.2 仪器与材料	69
3.3 实验方法	70
3.4 结果与讨论	74
3.5 本章小结	88

参考文献	89
第四章 明胶—硅氧烷纳米颗粒作为基因载体的体内生物相容性和生物分布的研究	91
4.1 引言	91
4.2 仪器与材料	92
4.3 实验方法	93
4.4 结果与讨论	97
4.5 本章小结	114
参考文献	115
全文结论及展望	117
硕士期间发表论文情况	120
致 谢	121

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Reviews	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Four Effects of Nanoparticles	1
1.3 The Ways and Fates of Nanoparticles invading the human body	3
1.4 Factors of Toxicity of Nanoparticles.....	6
1.5 The Possible Mechanism of Biological Effects of Nanomaterials.....	8
1.6 Background of This Thesis.....	10
1.7 Main Focus of This Thesis.....	15
References	18
Chapter 2 Preliminary Study on Biodistribution of Au Nanoparticles	22
2.1 Introduction.....	22
2.2 Equipment and Materials.....	22
2.3 Experimental Methods	24
2.4 Results and Discussion.....	30
2.5 Summary.....	64
References	66
Chapter 3 <i>In vivo</i> Biocompatible Study & Biodistribution of NIR Sensitive Au-Au₂S Nanoparticles as Drug Delivery Vectors.....	67
3.1 Introduction.....	67
3.2 Equipment and Materials.....	69
3.3 Experimental Methods	70
3.4 Results and Discussion.....	74
3.5 Summary.....	88
References	89
Chapter 4 <i>In vivo</i> Biocompatible Study & Biodistribution of Gelatin-siloxane Nanoparticles as Gene Vectors.....	91
4.1 Introduction.....	91
4.2 Equipment and Materials.....	92

4.3	Experimental Methods	93
4.4	Results and Discussion.....	97
4.5	Summary.....	114
	References	115
	Conclusions and Future Works	117
	Selected Publications and Conference Presentations	120
	Acknowledgements	121

摘要

纳米生物材料进行生物相容性评价是纳米生物材料能否进入临床研究的关键环节。本论文研究内容是对纳米 Au、Au-Au₂S 和明胶—硅氧烷的体内生物安全性和生物分布进行了评价，研究结果如下：

1. 病理切片实验证实 100 μmol 不同粒径（12 nm、20 nm 和 50 nm）和不同形状（球状、立方体、棒状和菜花状）纳米 Au 不会造成组织免疫或炎症反应。在生物分布方面，纳米 Au 主要沉积于肝脏和脾脏等内皮网状系统，透射电镜观察到有团聚发生。在肺和肾脏也有少量分布。器官分布和体内残留量与时间、尺寸及形状有很大关系。
2. 我们合成了近红外敏感的药物释放载体 Au-Au₂S 纳米颗粒，并对其和载顺铂的 cisplatin-loaded Au-Au₂S 的体内生物相容性和生物分布进行了考察。通过溶血实验、急性全身毒性实验、血液生化实验、病理检验和透射电镜切片证实了纳米颗粒具有很好的生物相容性。在 1 分钟时间内，87%的纳米颗粒从血液中清除干净，沉积于肝脏、脾脏、肺和肾脏，除肾脏外，其它器官内的含量随时间延长而减少。两种纳米颗粒在健康小鼠的体内分布无显著差异。注射方法对 Au-Au₂S 的分布有很大影响：静脉注射 Au-Au₂S 后在肿瘤内分布极少，而瘤内注射 Au-Au₂S 后具有很好的 EPR 效应。因而是一种潜在的原位注射或被动靶向的药物释放载体，具有较好的临床应用前景。
3. 我们成功的合成了基因载体明胶—硅氧烷和明胶—硅氧烷—Tat 纳米颗粒。通过溶血实验、急性全身毒性实验、长期毒性实验、血液生化实验、病理检验等表征方法证实了这两种纳米颗粒具有较好的生物相容性。明胶—硅氧烷的生物分布与 Au-Au₂S 相似，主要沉积在肝脏、脾脏、肺和肾脏。但明胶—硅氧烷—Tat 纳米颗粒因为 Tat 具有很强的穿膜活性，在心脏、脑、肌肉和大肠内都有检测到。冰冻切片的荧光照片也证实了上述结论。本实验证明了明胶—硅氧烷纳米颗粒是一种很有前途的基因载体。

关键词：纳米颗粒；体内生物安全性；生物分布

Abstract

Biocompatibility evaluation of nano-biomaterials is the key step to enter clinical study. This paper was evaluating the *in vivo* biocompatibility and biodistribution of Au, Au-Au₂S, and gelatin-siloxane nanoparticles. The results were as follows:

1. We confirmed that 100 μ mol Au of different size and different shapes induced no immune or inflammatory response. The biodistribution, which as a close relationship with the time, the size and the shape, showed that the Au mainly deposited in reticuloendothelial system (RES) such as liver and spleen.
2. The Au-Au₂S NPs were successfully synthesized. It had good biocompatibility proved by hemolysis experiments, acute systemic toxicity, biochemical experiments, pathological testing and TEM. 87% of NPs were cleaned from the blood in a minute and the main deposited organs were the liver and spleen. Cisplatin-loaded NPs showed no significant difference of biodistribution in healthy mice. The methods of injection were a great influence on biodistribution in tumor-bearing mice: it was small in tumor by tail vein injection, while had a good enhanced penetration and retention effect by intra-tumor injection. Hence it was a potential *in situ* vaccination or passive targeted drug delivery carrier.
3. The gelatin-siloxane and gelatin-siloxane-Tat NPs were successfully synthesized. Both NPs had good biocompatibility which was confirmed by hemolysis experiments, acute systemic toxicity, chronic toxicity, biochemical experiments and pathological examination. The study of biodistribution and fluorescence photographs of frozen sections showed that Gelatin-siloxane NPs mainly deposited in the liver, spleen, lungs and kidneys; however, gelatin-siloxane-Tat NPs were not only in the liver, spleen, lungs and kidneys but also in the heart, brain, muscle and large intestine. Thus, the gelatin-siloxane NPs were potential gene vectors.

Key words: nanoparticles; *in vivo* biocompatibility; biodistribution

第一章 绪论

1.1 引言

诺贝尔奖得主 Rohrer 说过：当微米技术成为工业革命技术的基础，那些最早学会，并最早、最好使用微米技术的国家，都在工业的发展中占据了巨大的优势，成为了现在的先进工业国家。同样，21 世纪将属于那些明智的接受纳米技术，并首先学习和使用的国家^[1]。

纳米技术是 20 世纪 80 年代诞生并且正在崛起和迅速发展的新领域，它所研究的对象是尺寸在 0.1—100 nm 之间的物质所组成的体系的运动规律和相互作用以及可能的实际应用中的技术问题的科学技术^[2]。

随着纳米技术的产业化，各种形式的纳米尺度的物质已经以各种不同的途径进入我们的生活。比如，纳米材料目前已经应用于染料、涂料、医药诊断等传统产业中，或在生产和使用过程中直接进入人体，或通过环境、食物链进入人体。总之，人们在工作 and 生活中接触到纳米材料的机会越来越多。

表 1-1 纳米材料示例^[3]

纳米构造物	颗粒尺寸	示例材料或应用
团簇物，纳米晶体，量子点	半径 1~10 nm	绝热器、半导体、金属、磁性材料
其它纳米颗粒	半径 1~100 nm	陶瓷氧化物
纳米线	直径 1~100 nm	金属、半导体、氧化物、硫化物、氮化物
纳米管	直径 1~100 nm	碳、也包括球状富勒烯、分层硫族化合物

1.2 纳米材料的四大效应

纳米材料具有三个共同的结构特点^[4]：（1）纳米尺度的结构单元或特征维度

尺寸在纳米数量级(1~100 nm)；(2) 存在大量的界面或自由界面；(3) 各纳米单元之间存在着或强或弱的相互作用。纳米材料的这些特点决定了它具有四个方面的效应并由此派生出许多传统固体所不具有的特异性。

1.2.1 体积效应

由于纳米颗粒体积极小，所包含的原子数少，相应的质量小，因此许多现象就不能用通常具有无限个原子的块状物质加以说明了，这种特殊的现象称之为体积效应。它表现为，当纳米颗粒的尺寸与传导电子的德布罗意波长相当或更小时，周期性的边界条件将被破坏，磁性、内压、光吸收、热阻、化学活性、催化性及熔点等都较普通颗粒发生了很大的变化。

1.2.2 表面效应

表面效应是指纳米颗粒表面原子数与总原子数之比随粒径的变小而急剧增大而引起的性质上的变化。随着粒径减小，表面原子数迅速增加，而表面原子的晶场环境和结合能与内部原子不同，有许多悬空键，具有不饱和性质，易与其它原子结合而稳定，故具有很大的化学活性，使得表面能增加^[5]。表面能增加，提供数目众多的表面反应活性中心。这种大的比表面积和表面原子配位不足，使得它与相同材料的大块材料相比具有较强的吸附。吸附分为两类，一类是物理吸附，即吸附剂与吸附相之间是以范德华之类较弱的物理力结合；另一类是化学吸附，即吸附剂与吸附相之间是以强化学键结合。弱的物理吸附很容易脱落，强的化学吸附不容易脱落。

1.2.3 量子尺寸效应

当颗粒尺寸下降到接近或小于某一定值时(颗粒波尔半径)，费米能级附近的电子能级由准连续能级变为分立能级，并且纳米颗粒存在不连续的最高被占据分子轨道能级和最低未被占据分子轨道能级，使得间隙变宽，这种现象称为量子尺寸效应^[6]。

当晶体的尺寸很小，与电子或空穴的德布罗意波长相当时，载流子的运动被局限在一个小小的晶格范围内，类似于盒子中的颗粒，是一种新的物质运动状态，

有别于分子、原子的运动状态。相对于块状固体中大晶体内的电子而言,在这种局限运动状态,电子的动能增加,原本连续的导带和价带发生能级分裂、能隙变宽,使颗粒的发射能级增加,光学吸收发生红移。量子尺寸效应不仅引起纳米颗粒的光学性质发生变化,而且其电学性质也有明显的差别。随着纳米颗粒粒径的减小,有效带隙增大^[7]。

1.2.4 宏观量子隧道效应

微观颗粒具有贯穿势垒的能力称为隧道效应。近年来,人们一直发现一些宏观量,例如纳米颗粒的磁化强度、量子相干器件中的磁通量以及电荷等也具有隧道效应,它们可以穿越宏观系统的势垒面而发生变化,称为宏观的量子隧道^[8]。这一效应与量子尺寸效应一起,确定了微电子器件进一步微型化的极限,也确定了采用磁带磁盘进行储存的最短时间,即量子隧道效应。

综上所述,纳米颗粒具有体积效应、表面效应、量子尺寸效应、宏观量子隧道效应,从而显示出许多奇异的物理化学性质,在诸多方面有着广泛的应用前景,逐渐成为人们研究的热点。也正因为这些奇特特性,其潜在的负面效应已引起人们的关注。2000年以来,《Nature》、《Science》杂志已先后多次发表编者文章,美国化学会《Environmental Science&Technology》以及欧洲许多杂志也纷纷发表编者文章^[9,10,11,12,13],与各个领域的科学家们探讨纳米材料与纳米技术的生物环境安全性问题,即纳米颗粒对人体健康、生存环境和社会安全等方面是否存在潜在的负面影响?

1.3 纳米颗粒入侵人体的途径及去向

纳米材料要对人体或其他生物体造成物理伤害,首先人体或其他生物体要能够接触到这种材料,其后它通过一定的途径进入体内,与细胞相互作用只要材料本身具有毒性,同时又能在靶器官中聚集至一定的剂量,它就会导致组织损伤。纳米颗粒的超微性使得纳米材料更易于被人体吸收,进入人体血液循环系统^[14,15]。一般而言,纳米材料进入人体主要通过呼吸道吸入、胃肠道摄入,或涂抹于皮肤透过皮肤吸收;还有很多纳米生物材料都是与人体直接接触的,例如,某些医疗器械在使用过程中可能有纳米材料从器械上脱落下来遗留在人体;某些纳

米材料制成的药物、药物载体、医用传感器等产品已在临床上得到广泛应用，它们通过口服、注射、皮敷等手段直接进入人体。

1.3.1 纳米颗粒通过呼吸道进入人体

纳米颗粒通过呼吸道进入人体，能够穿透血肺屏障进入血液循环。与普通颗粒相比，更易于从肺部转移至其他器官^[16]。空气中的微小颗粒被吸入人体后，会沉积在肺壁表面的纤毛上，这些微粒可通过气管内层细胞外的纤毛有规律的摆动，一部分上行至喉咙被排出体外，另一部分下行进入肺内气体交换组织，被巨噬细胞吞噬。这些含有微小颗粒的巨噬细胞，一部分可通过入气管道被排除体外，另一部分可通过肺部进入淋巴管而到达淋巴结。这两种机制都是将微小颗粒清除出可能引起毒性反应的脏器或者其他部位。但是纳米颗粒的超微性使得它与一般的微小颗粒的排出机制不同。肺泡内腔与血液之间仅相隔 $0.5\ \mu\text{m}$ ，相对于支气管来说血肺屏障的防御能力很弱，当其下行进入到气体交换组织时，纳米颗粒的微小尺寸使得它很容易随空气进入到肺泡当中。肺部拥有大约 3 亿个肺泡，表面积巨大、而且血流丰富，使得它成为纳米颗粒入侵血液的门户^[17]。

目前纳米颗粒毒理学研究的一个主要方向是肺毒理研究。研究发现纳米颗粒可以沉积在肺中，引起肺部损害。 TiO_2 ^[18]、 Al_2O_3 ^[19]、 G_2O_3 ^[20]惰性颗粒以及一些有机材料如聚苯乙烯颗粒在肺部的吸收、转移、分布引起肺部反应的程度大多随着粒径的不同而不同。纳米颗粒能够引起更严重的肺部炎症、上皮细胞增生、纤维化及肿瘤，甚至极高的死亡率^[错误！未定义书签。]。

1.3.2 纳米颗粒透过皮肤

皮肤是一个严格的生物屏障，几乎不转运任何营养物质。颗粒物质一般是无法渗入表皮层的，但表皮层易被损坏或穿孔而降低其抵御异物入侵的能力。如给烧伤创面外用纳米银敷料后，银颗粒就会进入血液，过量的银颗粒蓄积将会导致肝肾毒性^[21]。大量异物入侵或者是长期受异物入侵时（如某些物质或长期在阳光照射），会引起长期的或重复的皮肤炎症反应，最终会导致皮肤受损，严重时引起癌变。拿防晒霜为例，2003 年一项研究表明很多产品中使用的二氧化钛纳米微粒可以进入皮肤甚至细胞，并在细胞内产生自由基，破坏原有的基因，其长期

使用的安全性是值得评估的。

1.3.3 透过血脑屏障进入大脑

纳米生物技术的一项重要应用就是纳米靶向药物的开发。研究表明, 纳米颗粒是通过被动转运、载体介导或者吞噬作用跨越血脑屏障的^[22]。例如, 用聚山梨酯包被的纳米颗粒可以靶向载脂蛋白 E (apoE) 或者其他的血液成分。通过表面改性修饰得到的类似低密度脂蛋白的纳米颗粒可以与低密度脂蛋白受体结合并反应。负载在颗粒上面的药物就可以随之在这些细胞内释放并扩散到脑内或者直接跨过细胞单层。另外, 其他的结构, 如紧密连接及 P 糖蛋白的作用也会影响纳米颗粒的透过。ASU 的科学家就曾经做过实验, 将克隆的细胞单层暴露于含有二氧化钛的培养液中, 结果细胞单层被破坏, 提示了纳米颗粒的细胞毒性或者对细胞间连接有损伤。所以, 纳米颗粒究竟是怎样突破血脑屏障的, 对内皮细胞间紧密连接是否有损伤, 还有待于进一步确定。能够跨越血脑屏障的纳米药物固然受到欢迎, 但是意味着毒性物质也有可能通过这种途径进入大脑, 所以需要对纳米载药材料进行全面的安全性评价。

1.3.4 纳米颗粒能够穿透或者经过神经轴突进入大脑

美国纽约 Rochester 大学 Oberdorster 等^[23]通过阻滞大鼠的一侧的鼻孔追踪大脑半球的结果来证明纳米粒进入大脑的途径。纳米炭粒被小鼠吸入以后, 能在大脑嗅觉中枢的嗅球里发现纳米粒。药物和营养物质等进入大脑是通过血液进入大脑, Oberdorster 等^[24]认为碳纳米粒却是通过传输信号和收集气味的嗅球进入到大脑的。

1.3.5 纳米颗粒对心血管系统的作用

纳米材料对人体各器官究竟有怎样的影响还没有足够的证据, 目前的研究主要集中在心血管系统危害方面。已有研究显示自主神经系统将成为吸入纳米颗粒的终端作用部位。由于吸入环境中的纳米物质, 居民患心肌梗塞、粥样硬化和冠状动脉硬化的等心血管疾病的机率增高^[25]。关于这种作用有两种不同的假说: 一种假说认为, 由于吸入过量的纳米颗粒, 肺部发生大面积炎症, 释放各种介质,

进一步作用于心脏、凝血系统和心血管系统；另一种则认为，纳米颗粒是从肺部直接进入血液循环中，再作用于凝血系统和心血管系统。深入的研究还在继续进行。

1.3.6 纳米颗粒对其他系统的毒性

纳米颗粒对其他系统的毒性也逐渐受到重视。对其在心血管、消化、神经系统中的沉积和损害情况进行了研究发现，纳米颗粒除了在肺部被巨噬细胞吞噬或逃脱其监视而被上皮细胞吸收或进入间质外，仍有少部分可以转移至肺外组织如肝、脾、肾甚至骨髓，且颗粒直径越小，转移分数越大^[26]。进入肠道的纳米颗粒吸收效率也比同材料的微米级颗粒高，且吸收的颗粒可以经过淋巴管进入血液循环进入到肝(主要聚集在枯否细胞)及脾(脾小结)^[27]。纳米颗粒还可能通过血脑屏障影响中枢神经系统^[28]。但是，这些纳米颗粒肺外转移和沉积的证据并不能表明其对沉积部位产生了损害，有待于进一步研究。

1.4 纳米颗粒毒性作用的影响因素

1.4.1 纳米颗粒性状的差异

1.4.1.1 颗粒的表面积

纳米颗粒粒径较小，位于表面的原子占相当大的比例，表面积急剧变大。较高的表面积使处于表面的原子越来越多，不饱和键数目多于微米级颗粒，同时表面能迅速增加，使这些表面原子具有很高的活性，极不稳定，很容易与其他原子结合。表面积可能是反应超微颗粒毒性的一个重要参数。Brown 等^[29]将不同剂量下不同粒径的颗粒表示成表面积，发现表面积与肺部炎症指标多形核白细胞几乎成一过零点的直线。所以认为表面积可能是引起炎症的变量。

1.4.1.2 颗粒的数目

诸多纳米颗粒与微粒毒性比较的研究中，大多数是给予等质量的颗粒，这就意味着给予纳米颗粒和微粒的数目大有不同，纳米颗粒的数目可以大于微粒数目

3~4 个数量级, 且注入 1 天后滞留的纳米颗粒比微粒多 50%。Ferin 等^[30]研究发现当 TiO_2 纳米颗粒与微粒数目小于 1×10^{13} 时, 肺中保留颗粒数才开始呈指数上升。原因之一就是低于肺部负荷时, 纳米颗粒的清除率非常高而极少进入间质, 而一旦超过负荷(颗粒数超过 1×10^{13}), 肺部开始出现颗粒超负荷, 肺部保留数目开始增多。当 TiO_2 微粒数达到 1×10^{14} 时, 同样有极高的保留率, 这说明颗粒数目比颗粒大小更能决定吸收的多少。

1.4.1.3 颗粒的化学性质

人群吸入高剂量 MgO 纳米颗粒及微粒, 未观测到肺部炎症反应。而吸入 ZnO 纳米颗粒及微粒 20 h 后可检测到炎症细胞因子、肺部微环境的细胞反应^[31]。而两者在实验方法上并没有显著的差异。这也提示, 除了颗粒大小、数目、表面积、物理性质之外, 化学性质对颗粒毒性也有影响。

1.4.1.4 颗粒的表面包被情况

纳米颗粒被包被后, 颗粒的表面特性如不饱和键数目发生改变或者包被物本身产生毒作用, 使得颗粒毒性表现发生改变。将同一直径的纳米 TiO_2 用矽甲烷修饰成亲脂性, 注入大鼠后发现亲脂性颗粒引起的肺部炎症反应程度比亲水性颗粒轻。但是也有相反的结论: Heinrich^[32]给大鼠注入 2 mg 被修饰成亲脂性的 TiO_2 颗粒引起急性毒性死亡。颗粒表面吸附的许多物质如过渡金属元素、细菌等物质可通过氧化应激增加毒性作用。纳米颗粒表面包被物质的有无以及包被物的成分等均可改变颗粒的毒性表现。

1.4.1.5 颗粒的新鲜度

颗粒的新鲜与否可以影响其毒性。新鲜聚四氟乙烯烟尘的毒性比旧烟尘大, 因为陈旧颗粒容易聚集而使毒性减弱^[错误! 未定义书签。]。当然, 其他如纳米颗粒的暴露频度、持续时间、暴露浓度、接触方式等也是影响其对人体毒作用的因素。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库